

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 26.11.2018. godine, broj 4700/01-OĐ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

“Epidemiološke karakteristike, klinički faktori rizika i značaj genskih polimorfizama za nastanak posttraumatske sepse”

kandidata dr Olivere Đurić, zaposlene na Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Ljiljana Marković-Denić, komentor je Prof. dr Vesna Bumbaširević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Branko Milaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Klinički centar Srbije, Klinika za neurohirurgiju
2. Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za humanu genetiku
3. Prof. dr Nataša Maksimović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za epidemiologiju
4. Doc. dr Ivan Palibrk, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Centar za anesteziologiju i reanimatologiju Kliničkog centra Srbije
5. Doc. dr Deana Medić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Olivere Đurić napisana je na 163 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 9 slika, 65 tabela i 11 grafikona. Doktorska

disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U uvodu su detaljno prikazane definicije, epidemiološke karakteristike i javno-zdravstveni značaj povreda, zatim i klički značaj povreda usled brojnih komplikacija vezanih za njihovo lečenje. Zatim su predstavljene definicije, učestalost i značaj bolničkih infekcija nastalih kod pacijenata sa traumom, kao najčešćoj komplikaciji u ovoj populaciji kritično obolelih pacijenata. Nakon toga, dat je pregled definicija i dijagnostičkih kriterijuma infekcija krvi i sepse, kao i istorijat definicija sepse. Istaknut je značaj hemokulture u dijagnozi i ishodu lečenja sepse. Detaljno su prikazani patofiziološki mehanizmi uključeni u nastanak sepse nakon traume. U potpunosti su objašnjeni modeli imunskog odgovora u traumi i sepsi. Ukazano je na značaj genetske osnove u nastanku sepse, odnosno polimorfizama pojedinačnih nukleotida kao najčešćeg tipa varijacija u genetskoj osnovi i njihovom uticaju na imunoinflamatorni odgovor u toku traume i sepse. Dat je detaljan prikaz lokalizacije i karakteristika TNFA, LTA, TLR2 i TLR4 gena kao i njihovih uloga u ekspresiji proinflamatornih citokina, tumor faktora nekroze i limfotoksina alfa i receptora sličnih Toll-u 2 i 4, važnih u prepoznavanju komponenti patogena i modulaciji imunskog odgovora u toku infekcije. Navedeni su ključni polimorfizmi navedenih gena i njihova povezanost sa nastankom sepse.

Dat je dosadašnji pregled literature i ukazano je na brojne kliničke faktore koji mogu uticati na nastanak infekcije krvi i sepse, praćenih nepovoljnijim ishodom lečenja, kao i na složene patofiziološke mehanizme koji su uključeni u nastanak ovih komplikacija kod pacijenata sa traumom. Ukazano je takođe na značaj genetske osnove u nastanku sepse kao i na limitacije u dosadašnjoj literaturi koje se odnose na povezanost polimorfizama imunoinflamatornih gena i nastanku sepse kod ovih pacijenata i samim tim i potrebu za temeljnijim ispitivanjem ovog fenomena u našoj populaciji.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u proceni incidencije, epidemioloških karakteristika i faktora rizika koji doprinose nastanku infekcija krvi i sepse kod pacijenata sa traumom lečenih u JIL-u, da se utvrdi učestalost genotipova i alela odabranih polimorfizama gena TNFA, LTA, TLR2 i TLR4 koji kodiraju proinflamatorne citokine TNF- α i TNF- β i receptore TLR-2 i TLR-4 u grupi pacijenata sa posttraumatskom sepsom, pacijenata sa traumom bez sepse i zdravih kontrola, kao i da se utvrdi da li postoji razlika u distribuciji polimorfizama navedenih gena u ove tri grupe.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da je istraživanje sprovedeno iz dva dela. Prvi deo istraživanja je predstavljao kohortnu studiju sprovedenu u populaciji traumatizovanih pacijenata hospitalizovanih zbog mehaničkih povreda u nekoj od dve JIL Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije (hirurška i trauma JIL) u periodu od 01.11.2014. do 30.4.2016. godine. U drugom delu istraživanja je sprovedena ugnježdjena studija slučajeva i kontrola u kojoj je poređena distribucija genskih polimorfizama između tri grupe ispitanika: pacijenata sa traumom koji su dobili sepsu, pacijenata sa traumom koji nisu dobili sepsu i kontrolnoj grupi zdravih osoba iz populacije Srbije čiji se podaci nalaze u biobanci Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Molekularno-genetička ispitivanja vršena su na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu i Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu. Istraživanje je odobrio Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu odlukom N° 29/X-5, od 6.10.2015. godine. Saglasnost za sprovođenje istraživanja dobijena je od direktora Urgentnog centra Kliničkog centra Srbije.

Nabrojani su kriterijumi za selekciju ispitanika. Detaljno su opisani metodologija i prikupljanje podataka za potrebe ovog istraživanja. Pomoću predhodno konstruisanog epidemiološkog upitnika prikupljeni su podaci o demografskim karakteristikama pacijenata, kliničkim parametrima vezanim za stanje pacijenta na prijemu na odeljenje reanimacije i JIL, podaci o karakteristikama i težini povreda, kao i podaci o svakodnevnom vitalnom statusu pacijenata, biohemijskim parameterima, kao i podaci o nastanku infekcije krvi i sepse i prisustvu faktora koji do njih mogu dovesti (prisustvo CVK, mehaničke ventilacije, hirurške intervencije i njeno trajanje, hemodijalize itd.). Osim epidemiološkog upitnika primenjeni su i instrumenti i scoring sistemi za procenu stanja svesti (Glasgow koma skor), za procenu težine stanja na prijemu (APACHE II-*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* skor), za procenu organske funkcije - SOFA skor (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*) i za procenu težine povreda (ISS-Injury Severity Score).

U svrhu određivanja polimorfizama gena TNFA, LTA, TLR2 i TLR4 prikupljano je 4ml periferne krvi i sprovedena su molekularno-genetička ispitivanja koja su obuhvatala izolaciju i analizu polimorfizama pojedinačnih nukleotida. Genotipizacija u grupi traumatizovanih pacijenata vršena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real time PCR, RT PCR) pomoću komercijalnih TaqMan eseja. Detekcija i analiza polimorfizama u grupi zdravih kontrola rađena je pomoću metoda lančane reakcije polimeraze sa digestijom produkata restrikcionim enzimima i analizom polimorfizma dužine restrikcionih

fragemnata - PCR-RFLP (engl. polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism).

U statističkoj obradi podataka su korišćene metode deskriptivne statistike, χ^2 test, studentov t-test, univarijantna i multivarijantna logistička regresija, Kaplan-Majerova kriva preživljavanja i Log-rank test. Kappa statistika korišćena je za procenu slaganja američkih i evropskih definicija infekcija krvi. Pirsonov χ^2 i Yates-ov χ^2 test su korišćeni za poređenje opserviranih i očekivanih frekvencija alela (Hardy-Weinberg ravnoteža) kao i unakrsni odnos sa 95% intervalom poverenja sa Haldane-Anscombe korekcijom.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 254 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Nakon primene kriterijuma za isključivanje, od 848 pacijenata primljenih u JIL zbog traume, u kohortnu studiju je uključeno 406 pacijenata. Prosečna starost pacijenata bila je 48 godina i većina pacijenata je bila muškog pola (76,8%). Najčešći uzroci povreda bile su saobraćajne nesreće (56,2%), zatim pad sa visine (18,2%) i pad sa sopstvene visine (9,6%). Prosečna vrednost APACHE II skora bila je $10,6 \pm 6,9$ a SOFA skora 4 (interkvartilni opseg=3) što prema literaturi ukazuje na očekivani mortalitet manji od 10%. Povrede kod pacijenata primljenih u JIL su bile teške (srednja vrednost trauma (ISS) skora $19,9 \pm 8,5$) jer je najveći broj pacijenata (43,1%) zadobio povrede sa ISS skorom 16-24, koje se karakterišu kao teške povrede. Životno-ugrožavajuće povrede imalo je skoro trećina (27,6%) pacijenata primljenih u JIL.

Kumulativna incidencija infekcija povezanih sa zdravstvenom zaštitom, odnosno bolničkih infekcija, bila 27,3%. Od ukupno 406 pacijenata sa traumom, 57 je u toku lečenja u JIL imalo bar jednu epizodu infekcije krvi (kumulativna incidencija 14%), dok je stopa incidencija bila 11,8/1000 pacijenata-dana lečenja. Najčešći uzročnici infekcija krvi bile su Gram-negativne bakterije, *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. i *Klebsiella* spp., od kojih je većina predstavljala multirezistentne sojeve. Ukupni mortalitet pacijenata sa traumom bio je 21,9% i bio je dva i po puta viši u grupi pacijenata sa infekcijom krvi nego

kod pacijenata bez infekcije krvi (45,6% vs. 18,1%, $P < 0,001$). Laktati na prijemu $\geq 2\text{mmol/L}$, povećan SOFA skor na prijemu, broj dana sa CVK > 7 i broj dana na mehaničkoj ventilaciji > 7 su se izdvojili kao nezavisni prediktori infekcija krvi.

Kod 16% pacijenata je dijagnostikovana sepsa, od kojih je 52,3% imalo tešku sepsu. Stopa incidencije sepse iznosila je 15,7/1000 pacijenata-dana praćenja. Najčešći izvori infekcije kod pacijenata sa sepsom bili su pneumonija (47,7%) i infekcija krvi (27,7%). Najčešći uzročnik sepse bio je *Acinetobacter* spp. izolovan iz 38% uzoraka, dok je na drugom mestu bio *P. aeruginosa* izolovan iz 18% uzoraka. Pneumonije i infekcije operativnog mesta povezane sa sepsom najčešće je uzrokovao *Acinetobacter* spp., dok su uzročnici infekcija mokraćnog sistema najčešće bili *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp i *Proteus mirabilis*. Primarne infekcije krvi kod pacijenata sa sepsom najčešće su bile uzrokovane sojevima *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. i *P. aeruginosa*.

Bitan podatak je da je od svih hemokultura uzetih u momentu dijagnoze sepse, čak 41,5% je bilo negativno, dok je kod 38 pacijenata (58,5%) patogeni uzročnik infekcije detektovan u krvi. Uočena je visoka stopa rezistencije patogenih uzročnika sepse na antimikrobne lekove predstavljene u vidu markera antimikrobne rezistencije.

Faktori nezavisno povezani sa nastankom sepse kod pacijenata sa traumom bili su SOFA skor na prijemu u JIL, hitna operacija abdomena, povreda spoljašnjeg omotača tela, teška povreda grudnog koša ($\text{AIS}_{\text{grudni koš}} \geq 3$), teške povrede (ISS skor ≥ 16) i broj dana provedenih na mehaničkoj ventilaciji veći od 7.

U genetičkoj analizi podataka u koju je uključeno 228 pacijenata, 44 pacijenata je imalo sepsu, 184 pacijenata sa traumom nije imalo sepsu, dok je 110 zdravih osoba iz populacije predstavljalo kotronlu grupu zdravih osoba. A alel rs1800629 TNFA gena bio je značajno češći kod pacijenata sa posttraumatskom sepsom nego kod zdravih kontrola. T alel i CT+TT genotip rs4986791 (1196C/T) TLR4 gena su bili značajno češći kod pacijenata sa posttraumatskom sepsom nego kod traumatizovanih pacijenata bez sepse, dok je T alel bio značajno češći kod pacijenata sa posttraumatskom sepsom nego kod zdravih kontrola. Nije uočena razlika između alela i genotipova ostalih PPN.

Kada se u obzir uzmu klinički i genetski faktori koji doprinose nastanku sepse kod pacijenata sa traumom, multivarijantna logistička regresija je pokazala da su klinički faktori koji su značajno povezani sa nastankom posttraumatske sepse nakon uključivanja genetičkih polimorfizama u model, bili su teška povreda grudnog koša (UO 3,29, 95%IP 1,30-8,30, $p = 0,012$), sveukupno teške povrede prema ISS skoru većem od 16 (UO 10,50, 95% IP 1,26-87,76, $p = 0,030$) i više od 7 dana na mehaničkoj ventilaciji (UO 22,77, IP 7,99-64,94,

$p < 0,001$), dok je heterozigotni genotip (CT + TT) polimorfizma rs4986791 (C/T) TLR4 gena ostao značajan faktor rizika za nastanak posttraumatske sepse (UO 5,9, 95%IP 1,5 – 23,0, $p = 0,011$) i nakon korekcije za navedene kliničke karakteristike. Što je još značajnije, dodavanje polimorfizama u model povećalo je površinu ispod ROC krive i unapredilo prediktivnu moć modela u diferencijaciji pacijenata sa sepsom i onih bez sepse.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do sada je u svetu objavljen veliki broj studija o epidemiologiji sepse sa krajnje heterogenim rezultatima, dok kod nas nema ovakvih podataka. Razlozi za veliku heterogenost rezultata, osim izvora podataka o sepsi (klinički ili administrativni podaci), su i različite definicije koje su se koristile (neki prijavljuju septikemiju, neki tešku sepsu sa organskom disfunkcijom)(Angus i sar., 2001). Velika nacionalna studija sprovedena u Americi u periodu 2009-2014. godine, koja je obuhvatila 7.801.624 pacijenta i koja je obrađivala kliničke podatke, pokazala je da su stope incidencije, mortaliteta i ishodi sepse u ovom periodu stabilni (Rhee i sar., 2017). Stopa incidencije sepse procenjena prospektivnim kohortnim studijama predstavlja stopu „lečene” sepse i ne oslikava stvarno opterećenje zdravstvenog sistema ovim sindromom (Mayr i sar., 2014). Tako su *Gaieski* i saradnici pokazali da, korišćenjem različitih metoda, procenjena stopa incidencije može biti 3,5 puta veća ili manja (Gaieski i sar., 2013) .

Pacijenti kod kojih je sepsa praćena infekcijom krvi imaju prema literaturi lošiji ishod u odnosu na sepsu uzrokovanu pneumonijom ili abdominalnom infekcijom. *Mansur* i *Laupland* su pokazali da je sepsa uzrokovana infekcijom krvi praćena najvećim mortalitetom inakon 90 dana pa čak i nakon godinu dana od otpusta (Mansur i sar., 2015; Laupland i sar., 2004). Nasuprot tome, *Zahar* i saradnici su pokazali da, iako su u univarijantnoj analizi i primarne i sekundarne infekcije krvi bile češće kod umrlih nego kod preživelih, nakon korekcije za težinu bolesti i ostale parametre od značaja, ni lokalizacija ni uzročnik infekcije nisu bili povezani sa rizikom od smrtnog ishoda kod teške sepse (Zahar i sar., 2011).

Od veoma velikog značaja je podatak da oko 30% svih septičnih ishoda prođe bez utvrđene infekcije a čak 50% bez pozitivne hemokulture. Prva velika klinička studija o SIRS-u i sepsi je pokazala da je kod manje od polovine epizoda sepse uzročnik mikrobiološki nepotvrđen i da to varira od 42% kod pacijenata sa dva od četiri kriterijuma za SIRS do 57% kod pacijenata sa septičnim šokom (Rangel-Fausto i sar., 1995). U velikoj internacionalnoj studiji, *Alberti* i saradnici su pokazali da samo 26,2% pacijenata sa sepsom ima mikrobiološki

dokumentovanu infekciju (Alberti i sar., 2002). Ali, studija sprovedena u Španiji 2002. godine je pokazala da više od polovine (64,5%) epizoda sepse jeste mikrobiološki potvrđeno (Blanco i sar., 2008). U retrospektivnoj studiji iz 2016. godine, kod samo 30% pacijenata sa sepsom je zasejana hemokultura bila pozitivna (Novosad i sar., 2016).

Istraživanja o faktorima rizika za nastanak posttraumatske sepse u literaturi su prisutna tek od nedavno i ukazuju na kontroverznost rezultata i nedovoljnu istraženost ove oblasti. *Kisat* i saradnici su 2013. godine naveli stanje hipotenzije na prijemu kao nezavisan faktor rizika, što kasnije nije bilo potvrđeno (*Kisat* i sar., 2013). Slično je i sa Glazgov koma skorom, prijemom u JIL, i upotrebom kristaloida i kolida prilikom reanimacije. Uprkos navedenim kontroverznim rezultatima pomenutih studija, sve su pokazale da su muški pol, stariji uzrast, vrsta i opsežnost povreda značajni prediktori za nastanak sepse nakon teške traume. *Thornhill* je, na osnovu rezultata sistematskog pregleda literature, sve faktore rizika podelio u tri grupe: faktori povezani sa povredom, faktori odbrane domaćina i faktore koji se odnose na klinički odgovor na terapiju (*Thornhill* i sar., 2010). Prema ovom sistematskom pregledu, opekotine i penetrantne povrede nose veći rizik za nastanak sepse, zbog velike površine kože kontaminirane bakterijama kao i zbog povrede šupljih viscelarnih organa.

Povezanost varijacija gena TNF α i nastanka infekcije i/ili sepse bila je predmet proučavanja brojnih studija u populaciji kritično obolelih pacijenata lečenih u JIL ali ne i u našoj populaciji. Međutim rezultati dobijeni u ovako heterogenoj populaciji pacijenata koji imaju brojne komorbiditete, ili su na prijemu imali sepsu kao posledicu vanbolnički stečene infekcije, su krajnje oprečni. Što se tiče polimorfizma rs361525 TNF α gena na poziciji -238 koji kao posledicu ima prelazak G alela u znatno ređi A alel, samo dve studije su do sada analizirale povezanost ovog polimorfizma sa nastankom sepse u populaciji osoba sa traumom. *Gupta* i saradnici su u kohorti traumatizovanih pacijenata u Indiji pokazali da su nosioci A alela na poziciji -238 imali značajno veći rizik od dobijanja sepse (*Gupta* i sar., 2015). Nasuprot tome, *O'Keefe* i saradnici nisu pronašli povezanost ovog polimorfizma sa nastankom sepse niti sa mortalitetom usled sepse u kohorti od 152 teško poveđena pacijenta (*O'Keefe* i sar., 2002). U našoj populaciji, *Šurbatović* i saradnici su sprovedeli studiju o udruženosti TNF α /G-308A alela polimorfizma i komplikacija kod kritično obolelih osoba, i pokazali povezanost ovog polimorfizma sa većim procentom preživljavanja ali ne i sepsom i tipom infekcije (Gram-pozitivna, Gram-negativna ili mešovita) (*Šurbatović* i sar., 2010).

Polimorfizam +1350 (T>C) TLR2 gena nije proučavan u populaciji traumatizovanih pacijenata do sada, ni u svetu ni kod nas.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Djuric O, Markovic-Denic L, Jovanovic B, Bumbasirevic V. Agreement between CDC/NHSN surveillance definitions and ECDC criteria in diagnosis of healthcare-associated infections in Serbian trauma patients. *PLoS One* 2018;13(10):e0204893. doi: 10.1371/journal.pone.0204893
2. Djuric O, Markovic-Denic L, Jovanovic B, Jovanovic S, Marusic V, Bumbasirevic V. Laboratory confirmed bacterial bloodstream infections in level-I trauma intensive care unit in Serbia: incidence, causative agents and outcomes. *J Infect Dev Ctries (Journal of Infection in Developing Countries)* 2018; 12(12):1079-1087. doi:10.3855/jidc.10737
3. Djuric O, Markovic-Denic L, Jovanovic B, Bumbasirevic V. High incidence of multiresistant bacterial isolates from bloodstream infections in trauma emergency department and intensive care unit in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* [ahead of print] doi: 10.1556/030.66.2019.007.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija “**Epidemiološke karakteristike, klinički faktori rizika i značaj genskih polimorfizama za nastanak posttraumatske sepse**” dr Olivera Đurić predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju epidemioloških karakteristika infekcija krvi i sepse kod pacijenata sa traumom lečenih u jedinicama intenzivne nege, kao i otkrivanju kliničkih i genetskih faktora koji doprinose nastanku infekcije krvi i sepse u ovoj populaciji kritično obolelih. Sve ovo ima praktičan značaj u selekciji pacijenata koji su u većem riziku za nastanak infekcije i sepse pomoću poznavanja faktora rizika prisutnih već na prijemu pacijenta u JIL i mogućnosti prevencije sepse kod teško povređenih pacijenata. Ovome bi u budućnosti moglo doprineti i određivanje polimorfizama rs1800629 TNFA gena i rs4986791 (1196C/T) TLR4 gena.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima dobre naučne prakse. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio adekvatan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Olivera Đurić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 14.02.2019. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Branko Milaković

Prof. dr Nataša Maksimović

Doc. dr Deana Medić

Mentor:

Prof. dr Ljiljana Maković-Denić

Prof. dr Ivana Novaković

Doc. dr Ivan Palibrk

Komentor:

Prof. dr Vesna Bumbaširević
